

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000032

International filing date: 05 January 2005 (05.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-001427
Filing date: 06 January 2004 (06.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

06.01.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 1月 6日

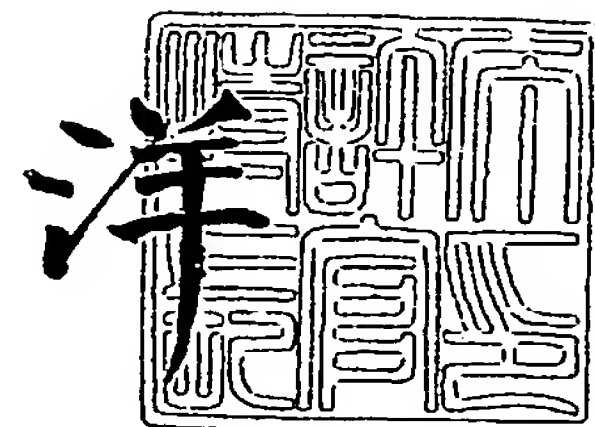
出願番号
Application Number: 特願2004-001427
[ST. 10/C]: [JP2004-001427]

出願人
Applicant(s): 株式会社林原生物化学研究所
真弓 忠範
堤 康央
中川 晋作

2005年 2月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3011357

【書類名】 特許願
【整理番号】 10104201
【提出日】 平成16年 1月 6日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 A61K 38/19
A61K 47/30
A61K 47/48
C07K 14/525
C12N 15/28

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府池田市石橋3丁目11番3号
【氏名】 真弓 忠範

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府豊能郡豊能町新光風台2丁目20番地の1
【氏名】 堤 康央

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府八尾市西木の本4丁目4番地の1
【氏名】 中川 晋作

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内
【氏名】 太田 恒孝

【特許出願人】
【識別番号】 000155908
【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所
【代表者】 林原 健

【特許出願人】
【識別番号】 502340701
【氏名又は名称】 真弓 忠範

【特許出願人】
【識別番号】 502339864
【氏名又は名称】 堤 康央

【特許出願人】
【識別番号】 502339875
【氏名又は名称】 中川 晋作

【代理人】
【識別番号】 100108486
【弁理士】
【氏名又は名称】 須磨 光夫
【電話番号】 03-3436-1070

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 055996
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

配列表における配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する TNF において、N 末端から 11、65、90、98、112、及び 128 番目のリジン残基のうち 1 又は 2 以上が、他のアミノ酸残基で置換又は欠失しており、かつ、N 末端から 29、31、32、145、146 及び 147 番目のアミノ酸残基又は 84 乃至 89 番目のアミノ酸残基のうち、1 又は 2 以上が他のアミノ酸残基で置換されている TNF アンタゴニスト。

【請求項 2】

配列表における配列番号 9 乃至 22 で表されるアミノ酸配列のいずれかを有する蛋白質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の TNF アンタゴニスト。

【請求項 3】

水溶性高分子と結合していることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の TNF アンタゴニスト。

【請求項 4】

水溶性の高分子がポリエチレングリコールであることを特徴とする請求項 3 に記載の TNF アンタゴニスト。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の TNF アンタゴニストを含んでなる TNF 阻害剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】TNFアンタゴニスト及びそれを有効成分とするTNF阻害剤

【技術分野】

【0001】

この発明は腫瘍壊死因子（以下、本明細書において「TNF」と略記する）変異体蛋白質、とりわけ、TNF受容体TNF-R1又はTNF-R2に特異的なアンタゴニスト及びそれを有効成分とするTNF阻害剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

TNFは、多くの腫瘍細胞に対して、極めて強力な抗腫瘍作用を発揮することから、抗癌剤としての活用が囑望されてきた。しかしながら、TNFは、細胞障害活性による生体への副作用が大きすぎるため、医薬品としてまだ利用されるには至っていない。また、TNFは、癌や感染症などの疾病時に患者の生体内で産生され、炎症反応を引き起こし、場合によっては症状を重篤化する因子ともなり得る。このため、TNFの作用を調節する方法の開発が望まれている。TNFの作用を調節する方法としては、TNFと結合する抗体を生体に投与し、TNFの活性を中和する方法があり、当該抗体を有効成分とする医薬品がすでに開発されている。しかしながら、この方法は、TNFによる有益な生体防御能のすべてを喪失させる恐れがある。

【0003】

ところで、TNFに対する受容体として、分子量55キロダルトンのTNF受容体（以下、「TNF-R1」と呼称する。）及び分子量75キロダルトンのTNF受容体（以下、「TNF-R2」と呼称する。）が存在することが知られている。非特許文献1には、マウスTNF-R2に結合しないヒト由来の α 型TNF（以下、「TNF- α 」と呼称する）は、両方の受容体と結合するマウスTNF- α とは異なった生物作用を発揮することが報告されている。したがって、TNF-R1又はTNF-R2のどちらか一方にのみに選択的に結合するTNF変異体蛋白質は、従来のTNFの持つ生物作用とは異なった作用を発揮することが期待される。

【0004】

TNF-R1又はTNF-R2のどちらか一方にのみ選択的に結合する、すなわち、受容体特異的なTNF変異体蛋白質を作製するにあたり、非特許文献1では、TNF- α におけるTNF-R1又はTNF-R2との結合部位を変異導入法によりそれぞれ調べ、その結果、TNF- α におけるN末端から29乃至34番目、86番目及び146番目のアミノ酸残基への変異導入は、TNF-R2への結合力を、また、143乃至145番目のアミノ酸残基への変異導入はTNF-R1への結合力を低減させることが開示されている。とりわけ、N末端から32番目のアルギニン（R）がトリプトファン（W）に、N末端から86番目のセリン（S）がトレオニン（T）に変異されたTNF- α 変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力を保持したまま、TNF-R2との結合力を著しく低減することを開示されている。さらに、特許文献1及び2、非特許文献2及び3を参照すると、受容体特異性を付与するためには、TNF- α のN末端から29乃至34、81乃至89、143乃至147番目のアミノ酸残基に変異導入したTNF- α 変異体蛋白質を作製し、スクリーニングすることが有望であると考えられる。なお、上記文献において、受容体特異的なTNF- α 変異体蛋白質が作成されており、それらはTNFとしての活性を保持するいわゆるアゴニストである。これらは、TNFの薬効を期待してのTNF製剤としての利用が期待できる。

【0005】

一方、生体内で産生されるTNFに対しては、TNFとしての活性を保持していないTNF変異体蛋白質、つまりTNFアンタゴニストを、どちらか一方のTNF受容体へ結合せしめることにより、生体内で産生されるTNFとどちらか一方のTNF受容体の結合を阻害することによってなし得ることができる。しかしながら、上記文献にはどちらか一方のTNF受容体に特異的なアンタゴニスト活性を有するTNF変異体蛋白質が開示されて

おらず、受容体特異的なTNFアンタゴニストの開発が望まれる。

【0006】

【特許文献1】特開平6-256395号公報

【特許文献2】特開平7-285997号公報

【非特許文献1】ヴァン・オスターデ・エックス (Van Ostade X)、タベアニアー・ジェイ (Tavernier J)、プランジェ・ティー (Prange T)、フィアーズ・ダブル (Fiers W)、ローカリゼーション・オブ・ジ・アクティブ・サイト・オブ・ヒューマン・ツモア・ネクロシス・ファクター (hTNF) ・バイ・ミューテーション・アナリシス (Localization of the active site of human tumour necrosis factor (hTNF) by mutational analysis)、ザ・エンボ・ジャーナル (The ENBO Journal)、1991年、第10巻、第4号、827乃至836頁

【非特許文献2】ツァング・エックスエム (Zhang XM)、ウエーバー・アイ (Weber I)、チェン・エムジェイ (Chen MJ)、サイト・ディレクテッド・ミューテーション・アナリシス・オブ・ヒューマン・ネクロシス・ファクター・アルファ・レセプター・バインディング・サイト・アンド・ストラクチャー・ファンクショナル・リレーションシップ (Site-directed mutational analysis of human tumor necrosis factor-alpha receptor binding site and structure-functional relationship)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、1992年、第267巻、第33号、24069乃至24075頁

【非特許文献3】ローチャー・エイチ (Loetscher H)、スチューバー・ディー (Stueber D)、バンナー・ディー (Banner D)、マッケイ・エフ (Mackay F)、レスロイアー・ダブル (Lesslauer W)、ヒューマン・ツモア・ネクロシス・ファクター・アルファ (ティー・エヌ・エフ・アルファ) ・ミュータンツ・ウイズ・エクスクルーシブ・スペシフィシティ・フォー・ザ・55-kDa・オア・75-kDa・TNF・レセプターズ (Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors)、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)、1993年、第268巻、第35号、26350乃至26357頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

斯かる状況に鑑み、この発明は、TNF変異体蛋白質、とりわけ、TNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニスト、並びにそれを有効成分とするTNF阻害剤を提供することを課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は、TNF受容体の一種であるTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストを得るべく、網羅的にTNF変異体蛋白質を作製し、スクリーニングした結果、TNF-R1との結合力がTNF-R2との結合力よりも強いTNF変異体蛋白質又はTNF-R2との結合力がTNF-R1との結合力よりも強いTNF変異体蛋白質を得ることに成功した。これらのTNF変異体蛋白質は、TNFとTNF-R1又はTNFとTNF-R2との結合を拮抗阻害して、TNF-R1又はTNF-R2を介してのT

NFの活性を打ち消すことが可能なTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストであること、さらに、生体に投与しても毒性を示さないことを確認し、この発明を完成するにいたった。

【0009】

すなわち、この発明は、TNF-R1又はTNF-R2に特異的なTNFアンタゴニスト及び当該蛋白質を有効成分とするTNF阻害剤を提供することによって前記課題を解決するものである。

【発明の効果】

【0010】

この発明のTNFアンタゴニストは、TNF-R1又はTNF-R2を介してのTNFの作用を抑制することができる。また、ポリエチレングリコールなどの水溶性の高分子と結合させれば、より生体内の安定性を向上させることが可能となり、少ない投与量で、所期の成果を達成することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

この発明でいうTNF-R1特異的とは、TNF-R2よりもTNF-R1との結合力に優れ、TNFとTNF-R1との結合を拮抗阻害する能力を有する蛋白質を意味し、TNF-R2特異的とは、TNF-R1よりもTNF-R2との結合力に優れ、TNFとTNF-R2との結合を拮抗阻害する能力を有する蛋白質を意味する。この発明でいうTNFアンタゴニストとは、TNF受容体と結合するがTNF活性を示さない蛋白質を意味する。この発明のTNFアンタゴニストは、TNF-R1又はTNF-R2のどちらか一方の受容体との結合力が強ければ強いほど、もう一方の受容体への結合が弱ければ弱いほど好ましい。

【0012】

この発明のTNF-R1又はTNF-R2に特異的なTNFアンタゴニストは、配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するTNF- α をコードするDNAに、所望の位置にNNS配列（Nは塩基がA、T、G又はCを、Sは塩基がG又はCを示す）を常法のPCR技術などにより導入し、ファージディスプレイ法により、所期の特性を有するクローンを選出することによって得ることができる。また、TNF- α の代わりに、TNF- α のN末端から11、65、90、98、112、128番目のリジン残基のうち1又は2以上が欠失、又は他のアミノ酸残基に置換した、好ましくは、配列表における配列番号2乃至4の塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有するTNFリジン変換体（以下、単に「リジン変換体」という）を基にすることもできる。具体的にいえば、まず、TNF-R1又はTNF-R2への結合力を変化させるために、配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列、又は配列表における配列番号2乃至4の塩基配列に併記されるアミノ酸配列において、それらのN末端から29、31、32、145、146及び147番目のアミノ酸残基をランダムなアミノ酸に置換（配列表における配列番号5）するか、また、それらのN末端から84、85、86、87、88及び89番目のアミノ酸残基をランダムなアミノ酸に置換（配列表における配列番号7）するために、常法のオリゴDNA合成技術、PCR技術、DNAライゲーション技術などを駆使して、上記位置のアミノ酸残基のコドンにNNSに置換したTNF変異体蛋白質をコードするDNA（配列表における配列番号6又は8）を作製する。得られたDNAはファージライブラリーを作製するために、ファージミドベクターに組み込み、蛋白質を発現させた後、TNF-R1（GENBANK M58286に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質）又はTNF-R2蛋白質（GENBANK M55994に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質）と結合するファージクローンを表面プラズモン共鳴原理を利用した機器などを用いてパニング法を行うことにより選択する。得られたクローンは、さらに、もう一方の受容体（TNF-R2又はTNF-R1）との結合性を調べ、2つの受容体に対する結合力に差を生じたクローンを選択し、基になったTNF- α あるいはTNFリジン変換体の2分の1、好ましくは10分の1、さらに好ましくは1、000分の1、最も好ましくは、検出可能レ

ベル以下までに片方の受容体への結合力が消失したクローンを選択する。選択されたクローンを、ヒト喉頭癌由来の細胞株 HEP-2 細胞 (ATCC CCL-23) 又はマウス結合組織由来の細胞株 L-M 細胞 (ATCC CCL-1.2) などの TNF 標的細胞を用いる公知のバイオアッセイによってその生物活性を測定する。その結果、活性が低いもの、例えば、TNF- α の 2 分の 1、好ましくは、10 分の 1、さらに好ましくは 1, 000 分の 1、最も好ましくは、検出可能レベル以下までに細胞障害活性が消失したファージクローンを選別する。

【0013】

斯くして得られるこの発明の TNF アンタゴニストは、配列表における配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する TNF- α 、又は、配列表における配列番号 2 乃至 4 の塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有する TNF リジン変換体において、それらの N 末端から、29、31、32、145、146 及び 147 番目のアミノ酸残基、又は、84 乃至 89 番目のアミノ酸残基の一部又は全てが他のアミノ酸又は終止コドンに置換されている。これらの TNF 変異体蛋白質は、TNF-R1 又は TNF-R2 特異的に結合するが TNF 活性を示さない、いわゆる、TNF-R1 又は TNF-R2 特異的な TNF アンタゴニストであることから、TNF-R1 又は TNF-R2 のどちらか一方と結合することにより、生体内で産生された TNF が TNF-R1 又は TNF-R2 のどちらかへ結合することを阻害する。したがって、生体内で産生された TNF に対して過剰量のこの発明の TNF アンタゴニストを投与することにより、生体内で産生された TNF の作用を TNF-R2 又は TNF-R1 を介しての TNF 活性のみに制御することができる。この発明の TNF-R1 特異的な TNF アンタゴニストとしては、例えば、配列表における配列番号 9 乃至 13 又は配列番号 19 乃至 22 で表されるアミノ酸配列を有する TNF 変異体蛋白質が好適であり、この発明の TNF-R2 特異的な TNF アンタゴニストとしては、例えば、配列表における配列番号 14 乃至 18 で表されるアミノ酸配列を有する TNF 変異体蛋白質が好適である。

【0014】

この発明でいう TNF リジン変換体とは、本発明者らによって、TNF- α の生物活性を低減させないように水溶性の高分子に結合させるために、TNF- α のアミノ酸配列の N 末端から 11、65、90、98、112 及び 128 番目のアミノ酸残基の 1 又は 2 以上のリジン残基を他のアミノ酸残基に置換又は欠失したものである（欧州公開特許 EP 1354893 号明細書参照）。配列表における配列番号 2 乃至 4 の塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有する TNF リジン変換体は、TNF- α と比較して、同等又は同等以上の活性を有しており、実質的に TNF-R1 及び TNF-R2 への結合力についても同等である。したがって、この発明の TNF-R1 又は TNF-R2 特異的な TNF アンタゴニストを水溶性の高分子に結合せしめて複合体として医薬品として利用する場合、蛋白部分にリジン残基を有しない TNF リジン変換体が有利である。配列表における配列番号 9 乃至 22 で表される上記のこの発明の TNF アンタゴニストは、TNF リジン変換体を基にして作製されており、全くリジン残基を有していないか又は 1 つしかリジン残基を有していないので、水溶性の高分子と複合体を作製するうえで好適な例であるといえる。なお、この発明の TNF アンタゴニストを水溶性の高分子と結合せしめることを意図しないならば、配列表における配列番号 9 乃至 22 で表されるアミノ酸配列において、その N 末端から 11、65、90、98、112 及び 128 番目のアミノ酸残基は、リジン残基であってもかまわない。

【0015】

この発明の TNF-R1 特異的な TNF アンタゴニストは、それらをコードする DNA、例えば、配列表における配列番号 26 乃至 26 で表される塩基配列のいずれかを有する DNA を用いて、常法の遺伝子工学技術により製造することができる。すなわち、必要に応じて、この発明の TNF-R1 又は TNF-R2 特異的な TNF アンタゴニストをコードする DNA のいずれかを PCR 反応によって増幅した後、蛋白質発現用のプラスミドベクターに組み込んで大腸菌などの宿主へ導入して形質転換し、得られる形質転換体から目

的とする蛋白質を産生するクローンを選択し、それを培養することによって所望量得ることができる。形質転換体の培養物から蛋白質を採取するには、例えば、透析、塩析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの蛋白質を精製するための汎用の方法を適用すればよく、必要に応じて、これらの方法は適宜組み合わせ用いられる。

【0016】

この発明のTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストは、生体内への安定性を向上させるために、適宜の水溶性の高分子を人為的に結合せしめることができる。この発明で用いる水溶性の高分子は、実質的に水溶性であって、とりわけ、生体にとって無害かつ抗原となり難い非蛋白質性のものが好ましい。具体的には、例えば、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコールなどの単独重合体、エチレングリコールとビニルアルコール、プロピレングリコールなどとの共重合体又はそれらの誘導体などの合成高分子や、エルシナン、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、プルラン、メチルセルロースなどの天然高分子が挙げられ、このうち、分子量が揃った調製物を入手し易い点で、ポリエチレングリコールの単独重合体、ポリエチレングリコールと他の水溶性の高分子との共重合体及びそれらの誘導体が好ましい。なお、水溶性の高分子の分子量は、平均分子量として、通常、500乃至100,000ダルトン、好ましくは、1,000乃至50,000ダルトンの範囲内から選択すればよい。分子量が均一化された水溶性の高分子を用いたい場合には、蛋白質への結合反応に先だって、例えば、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの汎用の方法によって分子量分画することも随意である。また、水溶性の高分子の形状は、直鎖構造及び分岐構造のもののいずれも用いることができるが、立体障害性の観点から分岐構造のものが好ましく用いられる。水溶性の高分子の種類や複合体の最終用途にもよるけれども、水溶性の高分子の分子量が上記範囲を下回ると体内動態を改善し難くなり、逆に、上記範囲を上回ると、複合体の生理活性が低下しすぎて、医薬品として使用できなくなることがある。

【0017】

TNFアンタゴニストへ斯かる水溶性の高分子を結合せしめるには、遊離のアミノ基へ特異的に反応して共有結合を形成する試薬により別途活性化させておいた水溶性の高分子を蛋白質に反応させるか、あるいは、遊離のアミノ基へ特異的に反応する官能基を有する多官能試薬により、蛋白質と水溶性の高分子とを架橋すればよい。反応方法としては、欧州公開特許EP1354893号明細書に記載されている方法に準じて行うことができる。また、斯界において汎用される方法、例えば、特開昭62-289522号公報などに記載されたエステル結合法、アミド結合法などを用いてもよい。蛋白質部分と水溶性の高分子との間に形成される結合は、安定な共有結合が形成されるアミド結合法によるものが好ましい。

【0018】

反応方法にもよるけれども、反応開始時における蛋白質と水溶性の高分子との割合は、モル比で1:0.1乃至1:100、好ましくは、1:0.5乃至1:50、最も好ましくは、1:1乃至1:10の範囲で加減する。一般に、この範囲を下回ると蛋白質同士の結合が顕著となり、反対に、この範囲を上回ると水溶性の高分子同士の結合が顕著となる。いずれにしても、反応と反応後の精製の効率を低下させることとなり、通常、上記の範囲で加減するのが望ましい。反応の際の温度、pH及び反応時間は、蛋白質が失活したり分解し難く、かつ、望ましくない副反応が最小になるように設定され、具体的には、反応温度を0乃至100℃、好ましくは、20乃至40℃、pHを0.1乃至12、好ましくは、pH5乃至9とし、0.1乃至50時間、好ましくは、10時間以内に反応が完結するように設定する。斯くして得られたTNFアンタゴニストと水溶性の高分子との複合体は、TNFアンタゴニストを精製する場合と同様の方法によって精製することができ、最終使用形態に応じて、例えば、濃縮、塩析、遠心分離、凍結乾燥などの方法により液状又

は固状とする。

【0019】

この発明のTNFアンタゴニスト、又はそれらと水溶性の高分子との複合体は、感受性疾患を治療及び／又は予防するための、又は、炎症などの症状を緩和するためのTNF阻害剤又はその有効成分として極めて有用である。この発明でいう感受性疾患とは、この発明のTNF阻害剤を単独で投与するか、あるいは、他の薬剤とともに投与することによって治療、予防、又は症状を緩和し得る疾患全般を意味し、具体的には、生体内でのTNFの過剰発現あるいは過剰投与により引き起こされる各種疾病、及び、TNFの過剰発現を引き起こす各種疾病であり、個々の疾患としては、例えば、結腸癌、直腸癌、胃癌、甲状腺癌、舌癌、膀胱癌、絨毛癌、肝癌、子宮癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、悪性黒色腫、神経芽細胞腫、卵巣腫瘍、睾丸腫瘍、骨肉腫、膵臓癌、副腎腫、甲状腺腫、脳腫瘍、悪性黒色腫、菌状息肉症などの固形腫瘍、白血病、リンパ腫などの血液系腫瘍、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性関節リウマチ、アレルギー、乾癬などの自己免疫疾患、悪液質、慢性及び急性炎症、関節炎、敗血症、播種性血管内凝固症候群、移植拒絶反応、対宿主移植片疾患、感染、卒中、虚血、急性呼吸困難症候群、再狭窄、脳障害、AIDS、SARS、骨疾患、アテローム性動脈硬化、川崎病、ベーチェット病、全身性紅斑性狼瘡、多臓器不全、マラリア、髄膜炎、劇症肝炎、ボウル病、アルツハイマー病などが挙げられる。したがって、この発明のTNF阻害剤は、斯かる疾患を治療及び／又は予防するための、又は炎症などの症状を緩和するための、医薬品として多種多様な用途を有することとなる。

【0020】

この発明のTNF阻害剤は、この発明のTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストとともにTNFを併用することにより、TNF-R2又はTNF-R1を介してのTNF活性を選択的に発揮させることが可能である。TNFとしては、TNF- α 又はTNF- β 、それらの変異体蛋白質、又は、それらと水溶性の高分子との複合体であってもよい。この発明のTNF阻害剤におけるTNFとTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストの配合量は、患者の症状に合わせて適宜設定すればよいが、片方の受容体を介してのTNF活性を実質的に発揮させないようにするためには、この発明のTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストをTNFに比べてモル比で100,000倍以上、好ましくは500,000倍以上配合すればよい。また、上記モル比未満であっても、片方の受容体を介してのTNF活性は部分的に抑制されるので、通常と異なったTNFの作用が発揮されることやTNFの副作用の軽減化が期待できる。したがって、TNFアンタゴニストとTNFの比率は、モル比で1乃至1,000,000倍、好ましくは、10乃至1,000,000倍、さらに好ましくは100乃至1,000,000倍から選ばれる。

【0021】

適用対象となる感受性疾患の種類や症状にもよるけれども、この発明によるTNF阻害剤は、投与経路に応じて、1回当たりの用量として、その有効成分を0.25ng/kg体重以上、好ましくは、2.5ng乃至400mg/kg体重を投与し、用途に応じて、エキス剤、エリキシル剤、下気道吸入剤、カプセル剤、顆粒剤、眼科用徐放剤、丸剤、眼軟膏剤、口腔粘膜貼付剤、懸濁剤、乳剤、硬膏剤、座剤、散剤、錠剤、シロップ剤、浸漬剤、煎剤、注射剤、点滴剤、チンキ剤、点眼剤、点耳剤、点鼻剤、トローチ剤、軟膏剤、パップ剤、芳香剤、鼻用噴霧剤、リニメント剤、リモナーデ剤、流エキス剤、ローション剤などの形態のものに調製することができる。

【0022】

この発明のTNF阻害剤の適用及び好適な投与量を決定するために、患者の血液中のTNF及び可溶性TNF受容体(TNF-R1及びTNF-R2)濃度、患者の細胞表面のTNF受容体の発現数などを、常法のエンザイムイムノアッセイ、フローサイトメトリー法又は結合アッセイ法などにより計測することができる。

【0023】

この発明のTNF阻害剤は、いわゆる、投薬単位形態の薬剤をも包含するものとし、そ

の投薬単位形態の薬剤とは、この発明のTNFアンタゴニストを、例えば、1回当たりの用量又はその整数倍（4倍まで）若しくは約数（1/40まで）に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に分離した一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、例えば、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、座剤、散剤、錠剤、注射剤、点滴剤、パップ剤などが挙げられる。

【0024】

この発明のTNF阻害剤は、有効成分としてのこの発明のTNFアンタゴニスト以外の、例えば、賦形剤、軟膏基剤、溶解剤、矯味剤、矯臭剤、着色剤、乳化剤などの薬剤一般に汎用される適宜の調剤用薬を配合することを妨げない。また、この発明の目的を逸脱しない範囲で、TNFアンタゴニストとともに、他の有効成分として、例えば、外皮用殺菌消毒剤、創傷保護剤、消炎剤などの外皮用薬、ビタミンA剤、ビタミンB剤、ビタミンC剤、ビタミンD剤、ビタミンE剤、ビタミンK剤などのビタミン剤、カルシウム剤、無機質製剤、糖類剤、有機酸製剤、蛋白アミノ酸製剤、臓器製剤などの滋養強壮薬、クロロフィル製剤、色素製剤などの細胞賦活用薬、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質製剤、抗腫瘍性植物成分製剤などの抗腫瘍薬、抗ヒスタミン剤などのアレルギー用薬、抗結核剤、合成抗菌剤、抗ウイルス剤などの化学療法剤、さらには、ホルモン剤、抗生物質製剤、生物学的製剤などのこの発明のTNFアンタゴニスト以外の薬剤を1又は複数配合してもよい。

【0025】

さらに、この発明のTNFアンタゴニストは、免疫助成剤として、例えば、アクチノマイシンD、アセグラトン、イホスファミド、ウベニメクス、エトポシド、エノシタビン、塩酸アクラルピシン、塩酸イダルピシン、塩酸イリノテカン、塩酸エピルピシン、塩酸ゲムシタビン、塩酸ダウノルピシン、塩酸ドキソルピシン、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、塩酸ニムスチン、塩酸ピラルピシン、塩酸ファドゾール水和物、塩酸ブレオマイシン、塩酸プロカルバジン、塩酸ミトキサントロン、カルボコン、カルボプラチン、カルモフル、クエン酸タモキシフェン、クエン酸トレミフェン、クレスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、シクロホスファミド、シスプラチン、シゾフィラン、シタラビン、シタラビンオクホスファート、ジノスタンチンスチマラマー、酒石酸ビノレルビン、ソブゾキサン、ダカルバジン、チオテパ、テガフル、テガフル・ウラシル、テガフル・ギメスタット・オタスタットカリウム、ドキシフルリジン、ドセタキセル水和物、トレチノイン、ネオカルチノスタチン、ネダプラチン、バクリタキセル、ビカルタミド、ピシバニール、ヒドロキシカルバミド、ブスルファン、フルオロウラシル、フルタミド、ベントスタチン、ポルフィマーナトリウム、マイトマイシンC、ミトブリニトール、メトトレキセート、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、硫酸ブレオマイシン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ペプロマイシン、レンチナンなどの抗腫瘍薬などと組み合わせて用いることができる。また、インターフェロン、インターロイキンなどのサイトカイン、インシュリンなどのホルモン、及びそれらに対する抗体、結合蛋白質、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤又は可溶性受容体とともに用いられれば、いずれか一方のみでは容易に達成できない、相乗的に高い効果が得られる。

【0026】

この発明のTNF阻害剤は、経口経路で適用しても非経口経路で適用しても感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や症状にもよるけれども、具体的には、例えば、患者の症状や適用後の経過を観察しながら、体重1kg当たり0.01乃至1,000mg/日、好ましくは、0.1乃至100mg/日のTNFアンタゴニストを、必要に応じて、複数回に分けて1乃至7回/週の頻度で1週間乃至1年間に亘って経口経路で適用するか、あるいは、皮内、皮下、筋肉内、静脈内、鼻腔内、直腸内、腹腔内などの非経口経路により、注射又は点滴により適用する。この発明のTNFアンタゴニストと水溶性の高分子との複合体は、安定であって、血液中のプロテアーゼなどによって分解され難く、しかも、生体における滞留時間が、TNF- α やTNFアンタゴニストよりも有意に長く、投与経路によっては10倍以上にも達することから、同一の感受性疾患に対し

て同一の経路で適用する場合、投与量を有意に少なくすることができる実益がある。

以下、この発明の詳細につき、実験例に基づいて説明する。

【0027】

＜実験例1：TNF変異体蛋白質をコードするDNAライブラリーの作製及びスクリーニング＞

常法にしたがって、欧州公開特許EP 1354893号明細書に記載の実施例2に開示されているヒトTNFリジン変換体、すなわち、TNF- α の11番目、65番目、90番目、98番目、112番目及び128番目のリジン残基が、それぞれ、メチオニン、セリン、プロリン、アルギニン、アスパラギン、プロリン残基に置換された蛋白質をコードするDNA（配列表における配列番号2）を鋳型として、配列表における配列番号37及び38で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、さらに、得られたPCR産物を鋳型にして、配列表における配列番号39及び40で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、N末端から29、31、32、145、146、147番目のアミノ酸残基がランダムなアミノ酸残基に置換された配列表における配列番号5で表されるTNF変異体蛋白質をコードするDNA（配列表における配列番号6）を得た。また、同様にして、ヒトTNFリジン変換体DNA（配列表における配列番号2）を鋳型にして、配列表における配列番号39及び41で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、さらに、得られたPCR産物と配列表における配列番号42で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、N末端から84乃至89番のアミノ酸がランダムなアミノ酸に置換された配列表における配列番号7で表される蛋白質をコードするDNA（配列表における配列番号8）を得た。

【0028】

これらのDNAを常法にしたがって、ファージミドベクターpCANTAB 5E（アマシャムバイオサイエンス社製）へ導入し、N末端から29、31、32、145、146、147番目のアミノ酸残基の全てがランダムなアミノ酸残基に置換されたTNF変異体蛋白質、又は、84乃至89番のアミノ酸残基の全てがランダムなアミノ酸残基に置換されたTNF変異体蛋白質を発現したファージミドライブラリーを得た。このライブラリーに対して、TNF-R1（GENBANK M58286に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質）をセンサーチップに固定化した市販の表面プラズモン共鳴を利用した検出機器（商品名『BIACORE 2000』、ピアコア株式会社販売）を用いるパニング法を3回繰り返し適用することによって、TNF-R1に結合するファージクローン、また、同様にして、TNF-R2（GENBANK M55994に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質）を固定化したセンサーチップにより、TNF-R2に結合するファージクローンを得た。

【0029】

かくして得られたTNF-R1に結合するクローンに対してはTNF-R2を固定化したセンサーチップを、TNF-R2に結合するクローンに対してはTNF-R1を固定化したセンサーチップを用いた上記表面プラズモン共鳴を利用した検出機器により、受容体への結合力を測定し、受容体への結合力に差を有するクローンを選別した。さらに、得られたファージクロンのDNAを鋳型として、配列表における配列番号43（制限酵素Nde I切断部位、開始コドン、及びTNFアンタゴニストの5'末端付近の塩基配列を有する）及び配列番号44（制限酵素BamHI切断部位、終止コドン、TNFアンタゴニストの3'末端付近の塩基配列を有する）で表されるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、常法のPCR法により、プライマー配列に特異的なDNAを増幅した後、制限酵素Nde I及びBamHIにより消化してDNA断片とした。得られたDNA断片を、T7プロモーター領域、T7ターミネーター領域、アンピシリン耐性遺伝子領域及びColE1・Ori領域を有するプラスミドベクター（商品名『pET-3a』、ノバジェン社製）へ、常法にしたがって、その上記制限酵素部位に導入した。さらに、得られたプラスミドを大腸菌BL21DE3株へ導入し、TNF変異体蛋白質産生用の大腸菌を得た。常法

により、得られた大腸菌を培養した後、遠心分離により菌体を回収し、TES緩衝液（pH 8.0）（20 mM トリス塩酸、10 mM エチレンジアミン4酢酸、及び0.5 M 塩化ナトリウム）にて2回洗浄後、0.2 mg/ml リゾチームを含むTES緩衝液（pH 8.0）に加え、常法にしたがい超音波処理し、遠心分離し、産生されたTNF変異体蛋白質を含む残さを回収した。これを1（w/v）%トリトンエックス-100を含むTES緩衝液に加え、攪拌後に遠心分離して上清を除く操作を3回行い、得られた沈澱物を、8 M グアニジン塩酸塩及び50 mM ジチオスレイトールを含む50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）に加え、遮光下で室温で16時間攪拌し、遠心分離して上清を回収した。これに100倍量の1 M トリス、0.9（w/v）%塩化ナトリウム、0.4 M L-アルギニン塩酸塩、2.5 mM 還元型グルタチオン、0.5 mM 酸化型グルタチオン、0.05（w/v）%ツイーン20を含む水溶液に少量ずつ徐々に攪拌しつつ加えた後、4℃で16時間置した。これを4倍量の0.1（w/v）%ウシ血清アルブミンを含むリン酸食塩緩衝液（pH 7.2）に加え、pHを6.5乃至7.5に調整した後、常法にしたがって、Q-セファロース（ファルマシア社製）、Mono Q HR 5/5（ファルマシア社製）、スーパーロース12 HR 10/30（ファルマシア社製）及び／又は抗TNF- α 抗体カラムクロマトグラフィーにより、それぞれのTNF変異体蛋白質につき順次行って精製し、TNF変異体蛋白質を得た。得られたTNF変異体蛋白質は、常法のHEp-2細胞又はL-M細胞をを標的細胞として用いたバイオアッセイを適用することによって細胞障害活性を調べた。また、常法のDNAシーケンス法によって、それぞれのクローンのDNAの変異導入箇所の塩基配列を解読し、どのアミノ酸残基又は終止コドンに置換されているか調べた。また、細胞障害性及び受容体への結合力についての評価方法は、上記と同様の方法により大腸菌で産生させた組換え型TNF- α を対照にして、次のように設定した。

「4」：組換え型TNF- α よりも結合力若しくは細胞障害活性が2倍以上向上した

「3」：ほぼ同等（0.5乃至2倍）

「2」：0.5乃至0.1倍に低下

「1」：0.001乃至0.1倍に低下

「0」：0.001倍以下に低下

「-」：測定せず

結果を表1（29、31、32、145、146及び147番目のアミノ酸残基が置換されているTNF変異体）及び表2（84乃至89番目のアミノ酸残基が置換されているTNF変異体）に示す。

【0030】

【表 1】

クローン 番号	バイオアッセイ		受容体結合力		変異位置と変異後のアミノ酸残基及びそのコドン						備考
	HEp-2	L-M	TNF- R1	TNF- R2	29	31	32	145	146	147	
TNF- α (対照)	3	3	3	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	配列番号1
TNFリジン 変換体	3	3	3	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	
1	3	2	3	1	Gln cag	Arg agg	Trp tgg	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	
2	4	3	3	2	Thr acg	Gly ggg	Tyr tac	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	
3	4	1	3	1	Leu tcc	Ser agc	Asp gac	Ala gcc	Ala gcc	Arg cgc	
4	3	—	3	0	Lys aag	Ala gcc	Gly ggc	Ala gct	Ser tcg	Thr acg	
5	0	0	3	0	Arg agg	Ser tcg	His cac	Ser tcg	Gly ggc	Thr acc	配列番号9 配列番号23
6	1	—	3	1	Ser tcg	Arg cgg	Tyr tac	Ser tcc	Met atg	stop tag	配列番号10 配列番号24
7	1	—	2	1	His cac	Asn aac	Thr acg	Asp gac	Ser tcc	Asn aac	配列番号11 配列番号25
8	1	—	2	1	Arg cgc	Glu gag	His cac	Asn aac	Asn aac	Ala gcg	配列番号12 配列番号26
9	1	—	2	1	Ser agc	Pro ccc	Met atg	Ala gcc	Asn aac	Pro ccc	配列番号13 配列番号27
10	1	1	1	4	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Lys aag	Asp gac	Thr acg	配列番号14 配列番号28
11	0	0	0	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Arg cgg	Thr acg	Asp gac	配列番号15 配列番号29
12	1	1	1	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Arg agg	Glu gag	Thr acg	配列番号16 配列番号30
13	2	2	2	4	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Asp gac	Asp gac	配列番号17 配列番号31
14	2	2	2	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Asn aac	Asp gac	配列番号18 配列番号32

【0031】

【表 2】

クローン番号	バイオアッセイ		受容体		変異位置と変異後のアミノ酸残基及びそのコドン						備考
	HEp-2	L-M	TNF-R1	TNF-R2	84	85	86	87	88	89	
TNF- α (対照)	3	3	3	3	Ala gcc	Val gtc	Ser tcc	Tyr tac	Gln cag	Thr acc	配列番号1
15	2	2	2	1	Thr acc	Asn aac	His cac	Tyr tac	Ser tcg	Asn aac	
16	4	4	4	2	Ser agc	Ser tcg	Thr acc	Tyr tac	Pro ccc	Asp gac	
17	4	4	3	1	Ser tcg	Lys aag	Thr acc	Tyr tac	Thr acc	His cac	
18	4	4	4	1	Ser tcc	Pro ccc	Leu ctg	Tyr tac	Pro ccc	Lys aag	
19	4	4	4	1	Ser tcc	Tyr acc	Asn aac	Tyr tac	Asn aac	Gly ggc	
20	3	4	3	2	Ser tcc	Ser agc	Ala gcg	Tyr tac	Ala gcg	Ser agc	
21	4	4	4	1	Thr tcg	Ser tcg	Ala gcc	Tyr tac	Gly ggg	Pro ccg	
22	4	4	3	1	Ser tcg	Arg cgc	Val gtg	Tyr tac	Thr acc	Ala gcc	
23	4	4	4	1	Thr acg	Thr acg	Ala gcg	Tyr tac	Ser agc	Gly ggc	
24	4	4	4	1	Thr acg	His cac	Lys aag	Tyr tac	Pro ccg	Gln cag	
25	4	3	4	1	Ser agc	Lys aag	Thr acc	Tyr tac	Ser tcc	His cac	
26	4	2	4	1	Ser tcg	Ser tcc	His cac	Tyr tac	Arg agg	Phe ttc	
27	3	4	3	2	Thr acc	Pro ccc	Ala gcc	Tyr tac	Pro ccc	Arg cgg	
28	3	3	3	1	Thr acg	Lys aag	Ser tcc	Tyr tac	Ser tcc	Lys aag	
29	4	4	3	1	Thr acc	Glu gag	Gln cag	Tyr tac	Ser tcc	His cac	
30	4	4	3	2	Thr acg	Pro ccc	Gly cag	Tyr tac	Pro ccg	Ser tcc	
31	4	4	4	3	Ser agc	Lys aag	Thr acc	Tyr tac	Ser tcc	His cac	
32	3	4	4	2	Thr acg	Arg gac	Arg cgc	Tyr tac	Ser agc	Ser agc	
33	3	3	4	1	Asn aac	His cac	Arg agg	Tyr tac	Gln cag	Asp gac	
34	4	3	3	2	Ser tcc	Ala gcg	Asp gac	Tyr tac	Pro ccc	His cac	
35	0	0	4	0	Thr acc	Pro ccc	Ala gcc	Ile atc	Asn aac	Arg cgg	配列番号19 配列番号33
36	1	1	3	1	Ala gcg	Pro ccc	Gly ggc	Tyr tac	Ser tcc	His cac	配列番号20 配列番号34
37	1	1	3	1	Ser agc	Thr acc	Thr acc	His cac	Asn aac	Gln cag	配列番号21 配列番号35
38	1	1	3	1	Gly ggc	Gly ggc	Pro cgc	Tyr tac	Gln cag	Arg cgg	配列番号22 配列番号36

【0032】

表1に示すとおり、対照のTNF- α とTNFリジン変換体は同じ程度の細胞障害活性及びTNF受容体への結合力を示した。また、TNFリジン変換体を基にして作製されたTNF変異体蛋白質においては、クローン番号1乃至4のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等、TNF-R2への結合力は弱く、HEp-2細胞及びL-M細

胞を用いたバイオアッセイでは細胞障害活性を示した。一方、クローン番号5乃至9のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等または同等以下、TNF-R2への結合力は極めて弱く、HEp-2細胞及びL-M細胞を用いたバイオアッセイでは細胞障害活性が極めて減弱されていた。この結果から、これらのクローンはすべてTNF-R1特異性のTNF変異体蛋白質であるものの、クローン番号1乃至4のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアゴニスト、クローン番号5乃至9のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアンタゴニストであることが判明した。また、クローン番号10乃至14のTNF変異体蛋白質は、TNF-R2への結合力は対照の組換え型TNF- α と同等又は同等以上、TNF-R1への結合力は極めて弱く、HEp-2細胞及びL-M細胞を用いたバイオアッセイでは細胞障害活性が極めて減弱されていた。この結果から、クローン番号10乃至14のTNF変異体蛋白質は、TNF-R2特異的なTNFアンタゴニストであることが判明した。

【0033】

また、表2に示すとおり、対照のTNFリジン変換体と比較して、クローン番号15乃至34のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等又は同等以上、TNF-R2への結合力は同等又は同等以下であり、HEp-2細胞及びL-M細胞を用いたバイオアッセイではほぼ同等の細胞障害活性を示した。一方、クローン番号35乃至38のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等であり、TNF-R2への結合力は極めて弱く、バイオアッセイでは細胞障害活性が極めて減弱していた。この結果から、これらのクローンはTNF-R1特異的なTNF変異体蛋白質であるものの、クローン番号10乃至34のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアゴニスト、クローン番号35乃至38のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアンタゴニストであることが判明した。

【0034】

<実験例2: TNF拮抗阻害活性>

上記クローン番号35乃至38のTNF変異体蛋白質について、拮抗阻害活性をさらに詳細に調べた。10 ng/mlの常法の遺伝子工学技術を用いて製造した組換え型ヒトTNF- α と下記表3の濃度のTNF変異体蛋白質を含む培養培地を用いて、TNF-R1のみを多量に細胞膜表面に発現しているHEp-2細胞、または、TNF-R1及びTNF-R2を発現しているL-M細胞（TNF-R1の発現量はHEp-2よりも少ない）の生存率（値が小ほどTNFの細胞障害活性が強い）を測定した。結果を表3に示す。

【0035】

【表 3】

TNF アンタゴニスト (ng/ml)		TNF- α (ng/ml)	生存率(%)	
			HEp-2	L-M
0		10	9	17
クローン 番号 35	1,000	10	10	43
	10,000	10	18	58
	100,000	10	86	61
	500,000	10	103	64
クローン 番号 36	1,000	10	12	43
	10,000	10	13	54
	100,000	10	38	63
	500,000	10	74	59
クローン 番号 37	1,000	10	11	42
	10,000	10	18	51
	100,000	10	43	59
	500,000	10	75	72
クローン 番号 38	1,000	10	11	42
	10,000	10	22	47
	100,000	10	72	58
	500,000	10	95	70

【0036】

表 3 に示すとおり、強い細胞障害活性を示す 10 ng/ml の組換え型ヒト TNF- α 存在下、HEp-2 細胞の生存率は、 $100,000 \text{ ng/ml}$ 以上の濃度の TNF 変異体蛋白質の添加により、生存率 9 % から、実験に供した各クローンにおいて、それぞれ 86 %、38 %、43 % 又は 72 % に増加し、組換え型ヒト TNF- α の細胞障害作用が部分的に打ち消されていた。さらに、TNF 変異体蛋白質 $500,000 \text{ ng/ml}$ の濃度では、生存率はそれぞれ 103 %、74 %、75 %、95 % となり、ほぼ TNF- α の細胞障害作用が打ち消された。一方、TNF 変異体蛋白質の添加により、L-M 細胞では、生存率 17 % から、 $1,000 \text{ ng/ml}$ の濃度で生存率がそれぞれ 43 %、43 %、51 %、47 % となったが、 $500,000 \text{ ng/ml}$ の濃度でも生存率が 64 %、59 %、72 %、70 % にまでしか回復しなかった。この結果は、クローン番号 35 乃至 38 の TNF 変異体蛋白質は、TNF-R1 のみを豊富に発現する HEp-2 細胞に対しては、TNF の作用を打ち消すために比較的高濃度の TNF 変異体蛋白質を必要とするものの、HEp-2 細胞は TNF-R2 を発現していないゆえに、高濃度の TNF 変異体蛋白質によって、TNF の作用を完全に打ち消すことが可能であり、これに対して、TNF-R1 及び TNF-R2 の両方を発現する L-M 細胞に対しては、TNF-R1 を介しての TNF の作用は TNF-R1 の発現数が少ないために容易に打ち消すことができるものの、TNF-R2 によって介しての TNF の作用を打ち消すことができないので、高濃度の TNF 変異体蛋白質によっても TNF- α の細胞障害作用を打ち消すことができないと考えられた。したがって、この結果は、この発明の TNF アンタゴニストは、TNF-R1 特異性を有していることを物語っている。

【0037】

<実験例 3：TNF アンタゴニストと水溶性の高分子との複合体の調製>

実験例 1 の方法により得た 14 種類の TNF アンタゴニスト（クローン番号 5 乃至 14、35 乃至 38）を磷酸緩衝生理食塩水（pH 7.2）に濃度 0.1 乃至 1 mg/ml になるように溶解した後、水溶性の高分子としてモノメトキシ N-サクシニミジルプロピオネートにより活性化させたポリエチレングリコール（m-PAG-SPA、平均分子量 $5,000$ ダルトン）をモル比で蛋白質の 3 倍になるように加え、 37°C で 30 分間反応

させた。次いで、反応混合物へε-アミノカプロン酸をモル比で水溶性の高分子の10倍量加え、暫時静置して反応を停止させた後、反応混合物を陰イオン交換クロマトカラム（商品名『Mono S』、アマシャムバイオサイエンス社製）によりHPLC分画して蛋白質に結合していないポリエチレングリコールを除去して、この発明のTNFアンタゴニストを水溶性の高分子に結合した複合体を得た。これらを、HEp-2細胞を用いた実験例2に記載の競合試験に供し、同様にしてTNF拮抗阻害活性を測定したところ、作製した14種の複合体は、ポリエチレングリコールを結合していないそれぞれのTNFアンタゴニストの約70%のTNF拮抗阻害活性を有していることが判明した。

【0038】

<実験例4：急性毒性試験>

常法にしたがって、8週齢の雄性マウス（体重20乃至25g）に実験例1で得た14種類のTNFアンタゴニスト（クローン番号5乃至14、35乃至38）又は実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニストとポリエチレングリコールが結合した複合体のいずれかを、経皮、経口又は腹腔経路で注射投与したところ、TNFアンタゴニスト及びそれとポリエチレングリコールが結合した複合体のLD₅₀は、いずれの投与経路においても100mg/kg体重以上であった。このことは、この発明のTNFアンタゴニスト及びそれとポリエチレングリコールが結合した複合体がヒトやウシなどの家畜への投与を前提とする医薬品として、又は医薬品に配合して用いることが安全であることを物語っている。

【0039】

以下、この発明の実施の形態につき、実施例に基づいて説明する。

【実施例1】

【0040】

<液剤>

安定剤として1%（w/w）人血清アルブミンを含む生理食塩水に実験例1の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト（クローン番号5乃至14、35乃至38）又は実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニストとポリエチレングリコールとの複合体のいずれかを100mg/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過して滅菌して液剤を得た。

【0041】

本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療又は予防、及び症状を緩和するための注射剤、点眼剤及び点鼻剤などとして有用である。

【実施例2】

【0042】

<液剤>

安定剤として1%（w/w）人血清アルブミンを含む生理食塩水に実験例1の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト（クローン番号5乃至14、35乃至38）又は実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニストとポリエチレングリコールを結合した複合体のいずれかを10mg/ml、組換え型ヒトTNF-αを1μg/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過して滅菌して液剤を得た。

【0043】

本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療又は予防、及び症状を緩和するための注射剤、点眼剤及び点鼻剤などとして有用である。

【実施例3】

【0044】

<乾燥注射剤>

安定剤として1%（w/w）精製ゼラチンを含む生理食塩水100mlに、実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト（クローン番号5乃至14、35乃至3

8) とポリエチレングリコールとの複合体のうちのいずれかを 1 g、欧州公開特許 EP 1 354 893 号明細書の実施例 2 で得た生理活性複合体 (本出願明細書の配列表における配列番号 2 で表される塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有する TNF リジン変換体とポリエチレングリコールとの複合体) を 0.1 mg 溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌し、バイアル瓶に 1 ml ずつ分注し、凍結乾燥させた後、密栓して乾燥注射剤を得た。

【0045】

本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療又は予防、及び症状を緩和するための注射剤、点眼剤及び点鼻剤などとして有用である。

【実施例 4】

【0046】

<軟膏剤>

滅菌蒸留水にカルボキシビニルポリマー (商品名『ハイビスワコー』、株式会社和光純薬工業製造) とパイロジェンを除去した高純度トレハロース (商品名『トレハ』、株式会社林原製造) とをそれぞれ濃度 1.4% (w/w) 及び 2.0% (w/w) になるように溶解した後、実験例 1 の方法により得た 14 種類の TNF アンタゴニスト (クローン番号 5 乃至 14、35 乃至 38) のいずれかの適量を均一に混合し、pH 7.2 に調製して、1 g 当り TNF アンタゴニストを約 10 µg 含むペースト状物を得た。

【0047】

延展性と安定性に優れた本品は、TNF に起因する炎症、アレルギーなどの疾患の治療・予防するための軟膏剤として有用である。

【実施例 5】

【0048】

<錠剤>

無水結晶性 α-マルトース粉末 (商品名『ファイントース』、株式会社林原製造) に実験例 3 の方法により得た 14 種類の TNF アンタゴニスト (クローン番号 5 乃至 14、35 乃至 38) とポリエチレングリコールとの複合体のいずれかの適量を、それに対してモル比で 10,000 分の 1 量の欧州公開特許 EP 1 354 893 号明細書の実施例 2 の方法により得られた TNF 活性を有する生理活性複合体 (本出願明細書の配列表における配列番号 2 で表される塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有する TNF リジン変換体とポリエチレングリコールとの複合体) を均一に混合し、得られた混合物を常法により打錠して製品 1 錠 (約 200 mg) 当り TNF アンタゴニスト活性を有する生理活性複合体を約 10 mg、TNF 活性を有する生理活性複合体を約 1 µg 含む錠剤を得た。

【0049】

摂取性、安定性に優れた本品は、悪性腫瘍、ウイルス性感染、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

【産業上の利用可能性】

【0050】

以上説明したとおり、この発明の TNF アンタゴニスト又はそれを有効成分とする TNF 阻害剤は、医薬品の分野において、例えば、抗腫瘍剤、抗ウイルス疾患剤、抗感染症剤、炎症性疾患剤、免疫疾患剤などとして多種多様の用途を有する。また、この発明の TNF アンタゴニストは、ポリエチレングリコールなどの水溶性の高分子と結合させることにより、生体内の安定性を高めることが可能であるので、医薬品への利用に極めて有利である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

Tadanori Mayumi

Yasuo Tsutsumi

Shinsaku Nakagawa

<120> TNF antagonist and TNF inhibitor containing it as an effective ingredient

<130> 10104201

<160> 44

<210> 1

<211> 157

<212> PRT

<213> human

<400>

Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val
1				5					10					15	
Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg
		20					25						30		
Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu
		35					40					45			
Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile
65					70					75				80	
Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala
				85					90					95	
Ile	Lys	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Lys
			100					105					110		
Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys
		115					120					125			
Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe
	130					135					140				
Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu			
145					150					155					

<210> 2

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gtc	aga	tca	tct	tct	cga	acc	ccg	agt	gac	atg	cct	gta	gcc	cat	gtt	48
Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Met	Pro	Val	Ala	His	Val	
1				5					10					15		
gta	gca	aac	cct	caa	gct	gag	ggg	cag	ctc	cag	tgg	ctg	aac	cgc	cgg	96

Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg	
			20					25					30			
gcc	aat	gcc	ctc	ctg	gcc	aat	ggc	gtg	gag	ctg	aga	gat	aac	cag	ctg	144
Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	
		35					40					45				
gtg	gtg	cca	tca	gag	ggc	ctg	tac	ctc	atc	tac	tcc	cag	gtc	ctc	ttc	192
Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	
	50					55				60						
tcg	ggc	caa	ggc	tgc	ccc	tcc	acc	cat	gtg	ctc	ctc	acc	cac	acc	atc	240
Ser	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	
65					70				75						80	
agc	cgc	atc	gcc	gtc	tcc	tac	cag	acc	ccc	gtc	aac	ctc	ctc	tct	gcc	288
Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Pro	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	
			85				90					95				
atc	cgc	agc	ccc	tgc	cag	agg	gag	acc	cca	gag	ggg	gct	gag	gcc	aac	336
Ile	Arg	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Asn	
			100				105					110				
ccc	tgg	tat	gag	ccc	atc	tat	ctg	gga	ggg	gtc	ttc	cag	ctg	gag	cgc	384
Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro	
	115						120					125				
ggt	gac	cga	ctc	agc	gct	gag	atc	aat	cgg	ccc	gac	tat	ctc	gac	ttt	432
Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe	
	130					135					140					
gcc	gag	tct	ggg	cag	gtc	tac	ttt	ggg	atc	att	gcc	ctg				
Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu				
145					150				155							

<210> 3

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gtc	aga	tca	tct	tct	cga	acc	ccg	agt	gac	gcg	cct	gta	gcc	cat	gtt	48
Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Pro	Val	Ala	His	Val	
1				5				10				15				
gta	gca	aac	cct	caa	gct	gag	ggg	cag	ctc	cag	tgg	ctg	aac	cgc	cgg	96
Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg	
		20					25					30				
gcc	aat	gcc	ctc	ctg	gcc	aat	ggc	gtg	gag	ctg	aga	gat	aac	cag	ctg	144
Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	
		35					40					45				
gtg	gtg	cca	tca	gag	ggc	ctg	tac	ctc	atc	tac	tcc	cag	gtc	ctc	ttc	192
Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	
	50					55				60						
tcg	ggc	caa	ggc	tgc	ccc	tcc	acc	cat	gtg	ctc	ctc	acc	cac	acc	atc	240
Ser	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	
65					70				75						80	
agc	cgc	atc	gcc	gtc	tcc	tac	cag	acc	cgg	gtc	aac	ctc	ctc	tct	gcc	288

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Arg Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 atc gcc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc ctc 336
 Ile Ala Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Leu
 100 105 110
 ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag acc 384
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Thr
 115 120 125
 ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 4

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac gcg cct gta gcc cat gtt 48
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Ala Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc gac gtc aac ctc ctc tct gcc 288
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 atc gcc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc ctc 336
 Ile Ala Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Leu
 100 105 110
 ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag acc 384
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Thr
 115 120 125
 ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 5
<211> 157
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 5
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Xaa Asn Xaa Xaa
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Xaa Xaa Xaa Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 6
<211> 471
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 6
gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg nns aac nns nns 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Xaa Asn Xaa Xaa
20 25 30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

```

tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
nns nns nns ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
Xaa Xaa Xaa Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

```

<210> 7

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 7

```

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

```

<210> 8

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

```

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
  1           5           10           15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
          20           25           30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
          35           40           45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
          50           55           60
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
          65           70           75           80
agc cgc atc nns nns nns nns nns nns ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
          85           90           95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
          100          105          110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
          115          120          125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
          130          135          140
gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145           150           155

```

<210> 9

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

```

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
  1           5           10           15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Arg Asn Ser His
          20           25           30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
          35           40           45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
          50           55           60

```

Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Ser Gly Thr Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 10
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 10
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Ser Asn Arg Tyr
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Ser Met
145

<210> 11
<211> 157
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 11
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp His Asn Asn Thr
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Asp Ser Asn Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 12

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 12

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Arg Asn Glu His
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Asn Asn Ala Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 13

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 13

Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Met	Pro	Val	Ala	His	Val
1				5					10					15	
Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Ser	Asn	Pro	Met
			20					25					30		
Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu
		35					40					45			
Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Pro	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala
				85					90					95	
Ile	Arg	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Asn
			100					105					110		
Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro
	115						120					125			
Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe
	130					135					140				
Ala	Asn	Pro	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu			
145					150					155					

<210> 14

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 14

Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Met	Pro	Val	Ala	His	Val
1				5					10					15	
Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg
			20					25					30		
Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu
		35					40					45			
Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Pro	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala
				85					90					95	
Ile	Arg	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Asn
			100					105					110		
Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro
	115						120					125			
Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe
	130					135					140				

Lys Asp Thr Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 15
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 15
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Arg Thr Asp Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 16
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 16
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95

Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Arg Glu Thr Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 17
<211> 157
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 17
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Ala Asp Asp Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 18
<211> 157
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 18
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Ala Asn Asp Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 19
<211> 157
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 19
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Thr Pro Ala Ile Asn Arg Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 20
<211> 157
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 20

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Pro Gly Tyr Ser His Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 21

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 21

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ser Thr Thr His Asn Gln Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 22
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 22
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Gly Gly Pro Tyr Gln Arg Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 23
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 23
 gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg agg aac tcg cac 96
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Arg Asn Ser His
 20 25 30
 gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288


```

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
      85                      90                      95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
      100                      105                      110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
      115                      120                      125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
      130                      135                      140
tcg ggc acc ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
Ser Gly Thr Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145                      150                      155

```

<210> 24

<211> 441

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

```

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
  1                      5                      10                      15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg tcg aac cgg tac 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Ser Asn Arg Tyr
      20                      25                      30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
      35                      40                      45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
      50                      55                      60
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
      65                      70                      75                      80
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
      85                      90                      95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
      100                      105                      110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
      115                      120                      125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
      130                      135                      140
tcc atg tag

```

Ser Met
145

<210> 25
<211> 471
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 25
gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg cac aac aac acg 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp His Asn Asn Thr
20 25 30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
gac tcc aac ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
Asp Ser Asn Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 26
<211> 471
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 26
gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val

1	5	10	15	
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg cgc aac gag cac	96			
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Arg Asn Glu His				
20	25	30		
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg	144			
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu				
35	40	45		
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc	192			
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe				
50	55	60		
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc	240			
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile				
65	70	75	80	
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc	288			
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala				
85	90	95		
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac	336			
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn				
100	105	110		
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg	384			
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro				
115	120	125		
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt	432			
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe				
130	135	140		
aac aac gcg ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg				
Asn Asn Ala Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu				
145	150	155		

<210> 27

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt	48		
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val			
1	5	10	15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg agc aac ccc atg	96		
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Ser Asn Pro Met			
20	25	30	
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg	144		
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu			
35	40	45	
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc	192		
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe			
50	55	60	
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc	240		
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile			

65		70		75		80	
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc	288						
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala							
		85		90		95	
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac	336						
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn							
		100		105		110	
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg	384						
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro							
		115		120		125	
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt	432						
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe							
		130		135		140	
gcc aac ccc ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg							
Ala Asn Pro Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu							
145		150		155			

<210> 28

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt	48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val	
1	5
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg	96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg	
	20
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg	144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu	
	35
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc	192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe	
	50
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc	240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile	
65	70
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc	288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala	
	85
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac	336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn	
	100
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg	384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro	
	115
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt	432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe	

130	135	140
aag gac acg ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg		
Lys Asp Thr Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
145	150	155

<210> 29
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 29

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt	48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val	
1 5 10 15	
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg	96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg	
20 25 30	
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg	144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu	
35 40 45	
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc	192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe	
50 55 60	
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc	240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile	
65 70 75 80	
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc	288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala	
85 90 95	
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac	336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn	
100 105 110	
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg	384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro	
115 120 125	
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt	432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe	
130 135 140	
cgg acg gac ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg	
Arg Thr Asp Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu	
145 150 155	

<210> 30
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 30

```

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
  1           5           10           15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
          20           25           30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
          35           40           45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
          50           55           60
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
          65           70           75           80
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
          85           90           95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
          100           105           110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
          115           120           125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
          130           135           140
agg gac acg ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
Arg Glu Thr Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
          145           150           155

```

<210> 31

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

```

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
  1           5           10           15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
          20           25           30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
          35           40           45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
          50           55           60

```

```

tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140
gcc gac gac ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
Ala Asp Asp Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

```

<210> 32

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

```

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
agc cgc atc gcc gtc tcc tac cag acc ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
100 105 110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
115 120 125

```

ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 gcc aac gac ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
 Ala Asn Asp Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 33

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 agc cgc atc acc ccc gcc atc aac cgg ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
 Ser Arg Ile Thr Pro Ala Ile Asn Arg Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
 Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
 100 105 110
 ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
 115 120 125
 ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 34

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

```

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
  1           5           10           15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
          20           25           30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
          35           40           45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
          50           55           60
tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
          65           70           75           80
agc cgc atc gcg ccc ggc tac tcc cac ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
Ser Arg Ile Ala Pro Gly Tyr Ser His Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
          85           90           95
atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
          100          105          110
ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
          115          120          125
ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
          130          135          140
gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
          145          150          155

```

<210> 35

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

```

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
  1           5           10           15
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
          20           25           30
gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
          35           40           45
gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192

```

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 agc cgc atc agc acc acc cac aac cag ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
 Ser Arg Ile Ser Thr Thr His Asn Gln Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
 Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
 100 105 110
 ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Pro
 115 120 125
 ggt gac cga ctc agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt 432
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 36

<211> 471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

gtc aga tca tct tct cga acc ccg agt gac atg cct gta gcc cat gtt 48
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Met Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg 96
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 gcc aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg 144
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc 192
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 tcg ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc 240
 Ser Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 agc cgc atc ggc ggc ccg tac cag cgg ccc gtc aac ctc ctc tct gcc 288
 Ser Arg Ile Gly Gly Pro Tyr Gln Arg Pro Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 atc cgc agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aac 336
 Ile Arg Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Asn
 100 105 110
 ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag ccg 384

Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro
	115						120					125			
ggt	gac	cga	ctc	agc	gct	gag	atc	aat	cgg	ccc	gac	tat	ctc	gac	ttt 432
Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe
	130						135					140			
gcc	gag	tct	ggg	cag	gtc	tac	ttt	ggg	atc	att	gcc	ctg			
Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu			
145					150					155					

<210> 37

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as a primer having NNS sequences (for mutating the amino acid residues at the 29,31 and 32)

<400> 37

gacatgcctg tagcccatgt tgtagcaaac cctcaagctg aggggcagct ccagtgggns 60
 aacnnsnsg ccaatgccct cctggcc

<210> 38

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as a primer having NNS sequences (for mutating the amino acid residues at the 145 to 147)

<400> 38

cagggcaatg atcccaaagt agacctgccc snnsnnsna aagtcgagat agtcggg

<210> 39

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as a 5'-terminal linker to insert the PCR-amplified DNA in to a phagemid vector

<400> 39

cccagccggc catggccgtc agatcatctt ctcgaacccc gagtgacatg cctgtagccc 60
 atgtt

<210> 40

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as a 3'-terminal linker to insert the PCR-amplified DNA in to a phagemid vector

<400> 40

ggcaccggcg cacctgcggc cgcagatcca ccaccacca gggcaatgat cccaaagtag 60
ac

<210> 41

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as an anti-sense primer having NNS sequences (for mutating amino acid residues at the position 84-89)

<400> 41

ctggcagggg ctgcggatgg cagagaggag attgacgggs nnsnnsnnsn nsnnnsngat 60
gcggctgatg gtgtgggtga ggagcac

<210> 42

<211> 218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as a 3'-terminal linker to insert the PCR-amplified DNA in to a phagemid vector

<400> 42

ggcaccggcg cacctgcggc cgcagatcca ccaccacca gggcaatgat cccaaagtag 60
acctgcccag actcggcaaa gtcgagatag tcgggccgat tgatctcagc gctgagtcgg 120
tcaccggct ccagctggaa gaccctccc agatagatgg gctcatacca ggggttggcc 180
tcagccccct ctgggtctc cctctggcag gggctgcg

<210> 43

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as a 5'-terminal linker to insert the PCR-amplified DNA in to an expression vector

<400> 43

tatacatatg gtcagatcat ctctcgaac cccgagtg

<210> 44

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide as a 3'-terminal linker to insert the PCR-amplified DNA in to an expression vector

<400> 44

aaggatccct acagggcaat gatcccaaag tagac

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 この発明は、TNFアンタゴニスト、とりわけ、TNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニスト、並びにそれを有効成分とするTNF阻害剤を提供することを課題とするものである。

【解決手段】 配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するTNFにおいて、N末端から11、65、90、98、112、128番目のリジン残基のうち1又は2以上が、他のアミノ酸残基に置換又は欠失しており、かつ、N末端から29、31、32、145、146及び147番目のアミノ酸残基又は84乃至89番目のアミノ酸残基のうち、1又は2以上が他のアミノ酸残基に置換されているTNFアンタゴニスト及びそれを有効成分とするTNF阻害剤を提供することにより課題を解決する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 0 1 4 2 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 5 5 9 0 8]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 1 0 月 2 1 日

[変更理由]

住所変更

住 所

岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号

氏 名

株式会社林原生物化学研究所

特願 2004-001427

出願人履歴情報

識別番号

[502340701]

1. 変更年月日 2002年 9月18日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府池田市石橋3丁目11番3号
氏 名 真弓 忠範
2. 変更年月日 2004年11月15日
[変更理由] 住所変更
住 所 兵庫県神戸市西区糺台5丁目1番地の1 グラスアリーナ西神
中央907号
氏 名 真弓 忠範

特願 2004-001427

出願人履歴情報

識別番号 [502339864]

1. 変更年月日 2002年 9月18日
[変更理由] 新規登録
住所 大阪府箕面市栗生間谷西4丁目2番20-503号
氏名 堤 康央
2. 変更年月日 2004年 2月18日
[変更理由] 住所変更
住所 大阪府豊能郡豊能町新光風台2丁目20番地の1
氏名 堤 康央

特願 2004-001427

出願人履歴情報

識別番号

[502339875]

1. 変更年月日

2002年 9月18日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府八尾市西木の本4丁目4番地の1

氏 名

中川 晋作

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SUMA, Mitsuo
A.D TAIHEI BLDG. 5th Floor 19-15
Shimbashi 5-chome
Minato-ku, Tokyo 1050004
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 12 March 2005 (12.03.2005)	
Applicant's or agent's file reference WO1042	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP05/000032	International filing date (day/month/year) 05 January 2005 (05.01.2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 06 January 2004 (06.01.2004)
Applicant KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
06 January 2004 (06.01.2004)	2004-001427	JP	03 March 2005 (03.03.2005)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Authorized officer

Akremi Taieb

Facsimile No. +41 22 338 90 90

Telephone No. +41 22 338 9415